

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922.

N° 18.

APPLICATION DU PROCÉDÉ BIOCHIMIQUE

DE

Caractérisation du Glucose

à quelques extraits de la Pharmacopée française

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le novembre 1922.

PAR

G. de SAINT STÉBAN

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.

JURY { MM. BOUGAULT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
SOMMELET, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1922



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922.

N° 18.

APPLICATION DU PROCÉDÉ BIOCHIMIQUE

DE

Caractérisation du Glucose

à quelques extraits de la Pharmacopée française

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le novembre 1922.

PAR

G. de SAINT STÉBAN

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.



JURY { MM. BOUGAULT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
SOMMELET, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

—
1922

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. H. GAUTIER, Doyen, O. *, ☉ I.
 RADAIS, Assesseur, *, ☉ I.
 G. DURSANT, Secrétaire, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. *, ☉ I.	Botanique générale.
VILLIERS, *, ☉ I.	Chimie analytique.
H. GAUTIER, O. *, ☉ I.	Chimie minérale.
RADAIS, *, ☉ I.	Cryptogamie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. *, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☉ I.	Matière médicale.
COUTIÈRE, *, ☉ I.	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut ☉ I.	Physique.
GRIMBERT, *, ☉ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *, ☉ I.	Pharmacie chimique.
GUERBET, ☉ I.	Toxicologie.
DELÉPINE, *, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
BOUGAULT, ☉ I.	Pharmacie galénique.

Doyen honoraire : M. GUIGNARD, C. *, ☉ I.

Professeur honoraire : M. MOUREU, C. *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, *, ☉ I.	Minéralogie.
Marc HONNORAT, *, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
GUÉRIN, ☉ I.	Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ☉ I.	MM. GUÉRIN, ☉ I.	MM. GORIS, *, ☉ I.
DAMIENS, ☉.	LUTZ, ☉ I.	LAUNOY, *, ☉.
TASSILLY, *, ☉ I.		HÉRISSEY, *, ☉ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *, ☉ I.	Chimie générale.
COUSIN, ☉ I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ☉ I.	Microbiologie.
JAVILLIER, *, ☉, I.	Travaux généraux de 4 ^e année

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, *, ☉ I.

Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX, ☉ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BOUGAULT

PHARMACIEN EN CHEF DE L'HÔPITAL TENON.

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MA FAMILLE.

A MES AMIS.

INTRODUCTION.

Le procédé biochimique de caractérisation du glucose a été donné, en 1920, par BOURQUELOT et BRIDEL (1). Ce procédé utilise la réaction synthétisante que l'émulsine exerce sur le glucose en solution alcoolique. Son principe est le suivant :

Si, dans une solution alcoolique d'un mélange réducteur, on ajoute de l'émulsine, et si on constate une diminution du pouvoir réducteur, c'est que le mélange renferme du glucose qui aura formé, avec l'alcool employé comme dissolvant, un glucoside β non réducteur.

Ce procédé présente de grands avantages sur les autres procédés de caractérisation du glucose qui utilisent des propriétés n'appartenant pas exclusivement à ce sucre, à savoir :

- 1° la réduction à chaud de la liqueur cupro-potassique ;
- 2° la fermentation alcoolique en présence de la levure de bière ;
- 3° la formation, par l'action de l'acétate de phénylhydrazine, d'une osazone reconnaissable à sa forme cristalline.

(1) Recherche et caractérisation du glucose par un procédé biochimique nouveau (*Journal Pharm. Chim.* (7) 22, 1920, p. 209.

Aucune de ces propriétés n'est, en effet, spécifique du glucose.

Ainsi, les aldohexoses, les aldopentoses, les cétohexoses, les hexobioses tels que maltose, gentiobiose, cellobiose, lactose, etc..., des glucosides comme la verbénaline, certains principes immédiats comme les tanins, et certains phénols, hydroquinone pyrocatéchine, possèdent des propriétés réductrices.

De même, le lévulose, le galactose, le mannose, le maltose, le saccharose fermentent comme le glucose sous l'action de la levure de bière. En outre, lévulose et mannose donnent avec l'acétate de phénylhydrazine la même osazone que le glucose.

Au contraire le procédé biochimique de BOURQUELOT et BRIDEL utilise une réaction spécifique du glucose et permet ainsi de le caractériser en présence d'autres sucres réducteurs. Il fournit, de plus, des renseignements sur la proportion dans laquelle le glucose se trouve dans l'ensemble des produits réducteurs.

Une revue des travaux qui ont été faits sur ce sujet donnera une idée des résultats qu'on en peut attendre.

En donnant ce procédé biochimique de caractérisation du glucose, en 1920 (1), BOURQUELOT et BRIDEL ont montré d'abord que le glucose mélangé à du lévulose, du mannose, ou de l'arabinose se combinait avec l'alcool méthylique sous l'action de l'émulsine, comme s'il était seul. Ils ont illustré ensuite leur procédé de deux exemples.

Dans le premier, ils ont caractérisé le glucose dans les baies de Genièvre. 100 grammes de baies renfermaient

(1) *Loc. cit.*

8 gr.,376 de produits réducteurs, dont 1 gr.,640 de glucose. Ayant opéré en dissolvant l'extrait dans l'alcool méthylique, ils ont obtenu le méthylglucoside β formé dans la réaction, à l'état cristallisé.

Dans le second exemple, ils ont pu identifier le glucose dans un produit cristallisé qui se déposait au cours des opérations effectuées pour isoler le glucoside du *Loroglossum hircinum* L. Ce produit cristallisé était un mélange de glucose et de loroglossine dont on ne pouvait pas extraire le glucose à l'état pur. En dissolvant ce produit dans l'alcool méthylique et en faisant agir l'émulsine sur la solution, BOURQUELOT et BRIDEL ont constaté une diminution du pouvoir réducteur et ont réussi à obtenir à l'état pur le méthylglucoside β formé, preuve irréfutable de la présence du glucose.

La même année, les mêmes auteurs (1) ont appliqué le procédé dans le but d'éliminer le glucose d'un milieu complexe dans lequel ils connaissaient son existence : l'hydrolyse du gentianose par l'émulsine donne un mélange équimoléculaire de glucose et de saccharose. Mais, dans les conditions expérimentales réalisées, il existait, dans le milieu, du glucose, du lévulose et du saccharose, et les sucres réducteurs s'y trouvaient en telles proportions que la cristallisation du saccharose devenait impossible. BOURQUELOT et BRIDEL ont dissous les produits de la réaction dans l'alcool méthylique et ont fait agir l'émulsine. Ils ont pu, à la fin de la réaction, extraire à l'état cristallisé le méthylglucoside β formé. Le glucose étant

(1) Obtention biochimique du sucre de canne à partir du gentianose, (*Journ. Pharm. Chimique* (7) 22, 1920, p. 241.

ainsi éliminé, la cristallisation du saccharose s'est faite facilement.

En 1921, BOURQUELOT et BRIDEL (1) ont appliqué ce procédé à la recherche du glucose dans les produits de l'hydrolyse fermentaire de l'inuline. Dans une expérience témoin, ils ont pu caractériser le glucose mélangé à 12 parties de lévulose. Dans l'essai sur les produits de l'hydrolyse fermentaire de l'inuline, il ne s'est fait aucune combinaison. Il n'existait pas de glucose dans les produits essayés et la conclusion des auteurs que l'inuline est uniquement constituée par l'union de molécules de fructose -d est pleinement justifiée.

Jusqu'ici, si on excepte l'essai fait sur les baies de Genièvre, le procédé n'avait pas été appliqué à la recherche du glucose dans un milieu complexe tel qu'un extrait de plante. C'est pourquoi, en 1921, BRIDEL et ARNOLD (1) ont étudié la façon de l'appliquer aux végétaux. Après de nombreux essais sur les Fraises et les Raisins d'une part et sur les feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* L. d'autre part, ils ont proposé une méthode sur laquelle nous reviendrons en détail au cours de ce travail.

ARNOLD a appliqué cette méthode à un certain nombre de produits végétaux: fruits frais de *Viburnum opulus* L.; extrait aqueux de Quinquina rouge du Codex de 1908; extrait alcoolique de Cola du Codex de 1908; extrait alcoolique de Cola obtenu en traitant les noix fraîches par l'alcool bouillant (2).

(1) Sur l'application aux végétaux du procédé biochimique de recherche du glucose (*Bull. Soc. Chim. biol.*, **3**, 1921, p. 297).

(2) Sur l'application aux végétaux du procédé biochimique de recherche du glucose. (*Thèse Doctorat Univers. (Pharmacie)*, Paris 1922).

Il a caractérisé le glucose dans tous ces produits et il a obtenu le méthylglucoside β à l'état cristallisé. Les produits réducteurs ayant passé dans l'alcool à 95°, renfermaient du glucose dans les proportions suivantes :

	pour 100
Fruits frais de <i>Viburnum opulus</i> L....	50
Extrait de Quinquina rouge	43,6
Extrait de Noix de Cola sèches.....	53,7
Extrait de Noix de Cola fraîches.....	21,7

ARNOLD conclut que la méthode proposée permet de détecter avec certitude le glucose dans un extrait végétal, quelle que soit la proportion dans laquelle existe ce sucre.

Signalons enfin une dernière application du procédé, faite par BRIDEL, en 1922, pour identifier le sucre formé dans l'hydrolyse par l'émulsine du glucoside à essence à odeur de rose du *Sedum Telephium* L. (1),

Le sucre formé au cours cette hydrolyse s'étant combiné avec l'alcool méthylique sous l'action de l'émulsine et le produit formé ayant cristallisé sur amorce de méthylglucoside β , BRIDEL en a conclu que c'était du glucose.

J'ai pensé à appliquer la méthode, telle que l'ont indiquée BRIDEL et ARNOLD, à quelques extraits de la Pharmacopée française.

J'ai essayé les extraits de Gentiane, de styles de Maïs, de Muguet, de Digitale, de Belladone et de Jusquiame.

(1) Sur la présence d'un glucoside à essence dans les tiges foliées et les racines du *Sedum Telephium* L. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 4, 1921, p. 242).

Mon travail se divise en quatre chapitres :

Le premier chapitre est réservé aux opérations préliminaires qui ont pour but : la préparation de l'émulsine, et son essai ; la préparation d'un alcool méthylique de titre convenable et l'essai de cet alcool au point de vue formation de méthylglucoside β .

Le chapitre II comporte la description de la méthode de BRIDEL et ARNOLD avec les quelques légères modifications que j'y ai apportées.

Dans le chapitre III, on trouvera les essais détaillés effectués sur chacun des extraits dont je viens de parler.

Enfin, un dernier chapitre est réservé aux conclusions.

Je prie M. le Professeur BOUGAULT d'agréer ici l'expression de ma vive gratitude pour avoir bien voulu m'autoriser à effectuer mes recherches dans son laboratoire.

J'adresse également mes sincères remerciements à M. BRIDEL, pharmacien des Hôpitaux, mon vieil et excellent camarade d'Internat, qui, sans me marchander son temps pourtant si précieux, m'a guidé dans mes travaux, m'a prodigué de sages conseils et fait souvent de justes et bienveillantes observations.

CHAPITRE PREMIER.

Opérations préliminaires.

1^o **Préparation de l'émulsine.**— Comme il fallait avoir à sa disposition une quantité d'émulsine assez forte, afin que tous les essais soient faits avec le même produit fermentaire, j'ai traité 10 kilogrammes d'amandes douces. J'ai suivi, dans ses grandes lignes, le procédé décrit par H. HÉRISSEY (1). Mais, comme j'ai opéré, chaque fois, sur 2 kilogrammes d'amandes et que j'ai précisé certaines manipulations, il vaut mieux donner une opération en détail :

Les amandes (2 kilogrammes) sont plongées, par fractions de 250 grammes, une minute, dans l'eau bouillante ; aussitôt après les avoir retirées de l'eau bouillante on verse dessus de l'eau froide. La pellicule s'enlève ainsi très facilement. Les amandes mondées sont écrasées au hachoir universel de façon à obtenir un produit assez finement broyé. On les met alors à macérer dans 4 litres d'eau chloroformée demi-saturée. Il est préférable de laisser la macération se prolonger pendant 48 heures, car j'ai remarqué qu'on augmentait ainsi le rendement en émulsine de 2 à 3 grammes par kilogramme d'amandes. On presse ensuite à travers

(1) Recherches sur l'émulsine (*Thèse Doct. Université (Pharmacie)*, p. 44, Paris, 1899).

un sac de coutil et le liquide laiteux obtenu est additionné d'acide acétique pour précipiter la caséine. La proportion d'acide acétique à ajouter peut varier d'une préparation à l'autre ; mais, généralement, pour obtenir une bonne précipitation, il faut 16 cm³ d'acide acétique pour la quantité de liquide provenant du traitement de 2 kilogrammes d'amandes (3000 cm³ environ). Avant de filtrer, il est préférable d'attendre de 3 à 4 heures, afin que la caséine se soit bien déposée et que le liquide se soit à peu près éclairci. De cette façon, la filtration sur filtre mouillé est très rapide. Le liquide filtré est précipité par addition de 3 volumes d'alcool à 95°. On laisse déposer 12 heures, on décante le liquide surnageant en siphonnant et on verse le précipité sur un large entonnoir de Buchner. L'essorage demande généralement douze heures. On lave ensuite le précipité sur le filtre, d'abord à l'alcool à 95°, puis à l'éther. On le sèche alors dans le vide sulfurique. On évite ainsi des manipulations du précipité, manipulations amenant une perte inévitable, et l'émulsine sèche se pulvérise très facilement en donnant une poudre blanche.

J'ai obtenu en traitant, 10 kilogrammes d'amandes, en cinq opérations, 143 grammes d'émulsine, soit un rendement de 14 gr.,3 par kilogramme.

2° Préparation de l'alcool méthylique. — Dans les essais dont j'ai donné le résumé dans l'Introduction, BOURQUELOT et BRIDEL ont choisi l'alcool méthylique, parce que la glucosidification de cet alcool est facile à réaliser et qu'il présente, en outre, un avantage appréciable sur l'alcool éthylique : on peut extraire facilement le méthylglucoside β formé dans la réaction et l'obtenir à l'état cristallisé, tandis que l'éthylglucoside β qui est très hygroscopique serait impossible à extraire à l'état pur et cristallisé des milieux complexes dans lesquels s'est faite la synthèse,

L'obtention du produit de la réaction à l'état cristallisé est d'une grande importance : on a ainsi la preuve irréfutable de la présence du glucose. En effet, l'émulsine des amandes renferme toujours à côté de la glucosidase β une certaine quantité de galactosidase β qui, dans les conditions de l'expérience, peut combiner une faible proportion de galactose à l'alcool méthylique. Le pouvoir rotatoire du méthylglucoside β étant de $\alpha_D = -32^\circ,5$ et le méthylgalactoside β étant pratiquement inactif ($\alpha_D = -0^\circ,419$), il est facile de distinguer l'un de l'autre ces deux produits quand on les a obtenus à l'état cristallisé (1).

ARNOLD a essayé, au cours de son travail, de préparer de l'émulsine privée de galactosidase β en remplaçant l'alcool éthylique par d'autres liquides précipitant également l'émulsine, alcool méthylique et acétone, mais il n'a pas pu y parvenir.

L'alcool méthylique que j'avais à ma disposition, renfermait comme tous les alcools méthyliques du commerce, une certaine quantité d'acétone. J'ai employé cet alcool, sans avoir besoin de le débarrasser de l'acétone, car BOURQUELOT et VERDON ont montré que l'acétone était sans aucune influence sur la marche de la réaction (2).

Afin d'obtenir un liquide renfermant sensiblement 50 grammes d'eau pour 50 grammes d'alcool méthylique, ce qui est la proportion recommandée par BRIDEL et ARNOLD, et en quantité suffisante pour faire tous les essais, j'ai mélangé :

Alcool méthylique du commerce.....	2.600 gr.
Eau distillée.....	2.400 gr.

Afin de voir jusqu'où allait la glucosidification dans ce mélange et d'avoir ainsi un point de comparaison pour

(1) ARNOLD. — *Loc. cit.*, p. 7.

(2) Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre, étranger à la réaction (*Journ. Pharm. Chim.* (7), 7, 1913, p. 482).

mes essais ultérieurs, j'ai dissous 40 gr. de glucose pur dans quantité suffisante du mélange alcoolique pour faire 2.000 cm³. Cette quantité de 2.000 cm³ était nécessaire, car c'est cette solution de glucose dans l'alcool méthylique qui va me servir, au cours de mon travail, pour essayer les émulsines retirées des différentes expériences.

Un dosage de sucre réducteur a donné 2 gr.,057 pour 100 cm³.

La déviation était de + 2°14' ($l=2$).

A 100 cm³ de ce liquide, on a ajouté 1 gr. d'émulsine et l'on a observé la rotation à intervalles variables. On a obtenu les chiffres suivants :

	Rotation ($l=2$)	Changement de rotation
Au départ.....	+ 2°14'	
Après 3 jours	+ 1°24'	50'
— 7 —	+ 44'	1°30'
— 12 —	+ 12'	2° 2'
— 17 —	— 4'	2°18'
— 22 —	— 14'	2°28'
— 36 —	— 20'	2°34'
— 60 —	— 20'	

La réaction étant arrêtée, on a dosé de nouveau le sucre réducteur. On a trouvé 0 gr.,6364 pour 100 cm³.

Il s'est donc combiné 1 gr.,4206 de glucose, soit une proportion de 69,05 p.100.

En se reportant aux chiffres donnés par BOURQUELOT et VERDON (1), on voit que le mélange essayé renfermait :

Alcool méthylique.....	50,11
Eau	49,89

Cet essai a donné en outre l'activité de l'émulsine qu'on avait préparée et les chiffres cités plus haut serviront

(1) La réversibilité des actions fermentaires. Emulsine et Méthylglucoside β (*Journ. Pharm. Chim.* (7), 7, 1913, p. 377).

de point de comparaison pour établir l'activité des émulsines ayant agi dans les différents mélanges.

Les opérations préliminaires étant terminées, nous allons voir dans le chapitre suivant quelle est la méthode que nous avons employée pour caractériser le glucose dans les extraits.

CHAPITRE II.

Méthode de Bridel et Arnold pour la caractérisation biochimique du glucose.

BRIDEL et ARNOLD ont donné une méthode de caractérisation du glucose dans les végétaux. Comme je suis parti d'extraits tout préparés, je n'ai pris leur méthode qu'au moment où ils traitent l'extrait alcoolique, débarrassé des ferments contenus dans la plante. Je n'ai apporté que quelques modifications de détail que je signalerai au fur et à mesure.

L'extrait est dissous dans un volume d'eau distillée tel qu'on obtienne, avec 100 gr. d'extrait, 1.400 cm³ de solution. Cette solution est détequée complètement à l'extrait de Saturne. La quantité d'extrait de Saturne est très variable suivant les extraits, comme on verra dans le chapitre suivant et ne peut se déterminer que par tâtonnements. On sépare par essorage, le précipité plombique. Au lieu de le laver, j'ai préféré mesurer le volume du liquide filtré et voir à combien d'extrait il correspondait. Après élimination de l'excès de plomb du liquide par l'hydrogène sulfuré, j'ai opéré de la même façon sans laver le précipité de sulfure de plomb que j'essorais à la trompe. J'avais ainsi un liquide à évaporer correspondant à une quantité variable d'extrait initial, les variations étant dues

aux quantités de liquide retenues par le précipité plombique puis par le sulfure de plomb.

Le liquide filtré était évaporé à sec, sous pression réduite, sans dépasser $+ 50^{\circ}$ afin d'éviter l'action hydrolysante de l'acide acétique sur les hydrates de carbone et les glucosides pouvant se trouver dans l'extrait. On arrive de la sorte à éliminer totalement l'acide acétique surtout si l'on prend soin d'ajouter, à plusieurs reprises, de l'alcool à 95° , au liquide sirupeux et de l'agiter ensuite avec de l'éther qui dissout une grande partie de l'acide acétique. L'extrait ainsi purifié est épuisé par l'éther acétique hydraté et bouillant qui ne dissout pas de glucose, comme je l'ai reconnu, dans l'essai de l'extrait de Digitale et qui enlève un certain nombre de principes, matières grasses, matières résineuses, alcaloïdes, glucosides, etc..... L'enlèvement de ces produits est nécessaire, car ils sont, pour la plupart, solubles dans l'alcool à 95° et ils constitueraient autant de matières étrangères pouvant entraver l'action de l'émulsine, ou pouvant, comme les glucosides, fausser les résultats par suite de leur hydrolyse par le ferment, en solution méthylique.

L'extrait épuisé par l'éther acétique est traité, à plusieurs reprises, à l'ébullition, par l'alcool à 95° . Il faut faire des traitements de 20 minutes au moins, en agitant fréquemment pour faciliter l'action dissolvante de l'alcool. On laisse ensuite l'alcool 24 heures en contact avec l'extrait avant de décantier. On doit suivre la dissolution des produits réducteurs en opérant des dosages dans chaque liquide alcoolique. Généralement, les sucres passent dans le premier traitement et on peut limiter à trois le nombre des traitements à l'alcool à 95° .

Dans tous mes essais, la quantité de produits réducteurs existant dans le troisième traitement était minime et s'il restait du glucose dans l'extrait insoluble, il ne devait pas en rester une grosse quantité.

Les liqueurs alcooliques réunies sont distillées à sec, sous pression réduite, en présence du carbonate de calcium, qui assurera la neutralité du milieu, nécessaire à l'action synthétique de l'émulsine.

L'extrait obtenu est repris à froid par l'alcool méthylique dont on a vu la préparation au Chapitre I. On emploie des quantités variables d'alcool méthylique, suivant la teneur en sucre de l'extrait et suivant son poids : la teneur en sucre se trouve déterminée approximativement par les dosages effectués sur les liquides alcooliques.

La dissolution de l'extrait est parfois longue à opérer, mais il est préférable de ne pas chauffer pour éviter une perte possible d'alcool méthylique par évaporation. Au lieu de filtrer aussitôt après la dissolution opérée, j'ai pensé qu'il était préférable de décolorer autant que possible les solutions au noir animal qui enlevait ainsi des matières colorantes qui auraient pu se déposer sur l'émulsine et gêner son action. On verra, par la suite, que, malgré cette précaution, des solutions ont laissé déposer des matières colorantes sur l'émulsine.

Après filtration pour éliminer le noir animal, le liquide est prêt pour l'essai. On y dose les sucres réducteurs et, si possible, on détermine la rotation au polarimètre.

On ajoute de l'émulsine au liquide dans la proportion de 1 gr. pour 100 cm³ et l'on met les flacons renfermant les mélanges à l'étuve à + 20-25°, en ayant soin d'agiter au moins une fois par jour. J'ai effectué tous mes dosages de sucre réducteur par la méthode MOHR-BERTRAND, en utilisant les tables données par BERTRAND. D'une manière générale, ce procédé m'a donné toute satisfaction. J'ai éprouvé, toutefois, certaines difficultés au cours des dosages effectués sur des liquides renfermant une forte quantité de matières extractives et une faible quantité de produits réducteurs.

Le dosage du sucre réducteur est effectué tous les dix

jours. S'il y a du glucose en solution, on constate une diminution progressive de la quantité de sucres réducteurs. Puis cette diminution cesse. Cet arrêt de la réaction n'implique pas forcément que l'équilibre est atteint. Il faut avoir recours à plusieurs vérifications. J'ai suivi exactement, pour ces vérifications, les indications données par BRIDEL et ARNOLD (1).

1° Renouvellement du ferment. — On enlève, par filtration, l'émulsine ayant agi dans le liquide et on remet une dose d'émulsine fraîche. Quand le renouvellement du ferment n'amène aucun changement dans la composition des liquides, c'est que l'équilibre est atteint. Généralement, on constate que ce renouvellement provoque une reprise de la réaction, mais peu marquée et de peu de durée. La plupart du temps, cette seconde addition de ferment suffit pour atteindre l'équilibre ; par contre, il a fallu, dans certains cas, procéder à de nombreux renouvellements du ferment dont l'action était paralysée dès les premiers jours de contact et qui ne donnait lieu qu'à des synthèses faibles.

2° Essai du ferment ayant agi. — L'émulsine qu'on a recueillie par filtration est lavée à l'alcool à 95° et séchée à l'air. A 50 cm³ de la solution de glucose à 2 gr.,057 pour 100 cm³, dont on a vu précédemment la préparation, on ajoute 0 gr.,50 de cette émulsine et on suit, au polarimètre, la marche de la synthèse en la comparant avec celle que produit le ferment n'ayant pas agi et dont on a donné le détail à la page 14.

De l'essai du ferment on peut tirer les conclusions suivantes :

Une émulsine, retirée d'un milieu où la diminution des sucres réducteurs était arrêtée ou nulle, et gardant à

(1) *Loc. cit.*, p. 305.

l'essai une vitalité normale, donnait la preuve que l'équilibre était atteint dans le milieu ou qu'il n'y existait pas de glucose.

Une émulsine dont la vitalité était nulle ou fortement amoindrie, indiquait que, dans le milieu où elle avait agi, il fallait renouveler fréquemment le ferment qui s'y détruisait facilement.

3° Addition de glucose. — Une autre vérification que j'ai utilisée dans chaque essai, consiste à provoquer une reprise de la réaction synthétisante par dissolution dans le liquide d'une quantité connue de glucose et de voir si ce glucose ajouté se combine à l'alcool dans les proportions prévues (69,05 p. 100 pour l'alcool utilisé).

Mais, la preuve irréfutable de la présence du glucose dans le produit essayé n'en reste pas moins l'extraction du méthylglucoside β formé dans la réaction. On trouvera à chaque essai la méthode qu'on a suivie, soit pour obtenir le méthylglucoside β à l'état cristallisé, soit pour le caractériser au microscope par ses formes cristallines.

CHAPITRE III.

Application de la Méthode à six extraits de la Pharmacopée française.

J'ai appliqué cette méthode telle que je viens de l'indiquer à six extraits de la Pharmacopée française :

- 1° Extrait de Gentiane ;
- 2° Extrait de Muguet ;
- 3° Extrait de styles de Maïs ;
- 4° Extrait de Digitale ;
- 5° Extrait de Belladone ;
- 6° Extrait de Jusquiame.

1° Extrait de Gentiane.

La présence du glucose dans l'extrait de Gentiane est connue depuis de longues années. L'application du procédé à cet extrait n'a été, en quelque sorte, qu'une vérification de son efficacité.

On a opéré sur 120 gr. d'extrait qu'on a dissous dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 1.680 cm³. La défécation est complète en employant 2 cm³ d'extrait de Saturne pour 20 cm³ de liquide. On opère cette défécation sur 1 400 cm³ de solution (correspondant à 100 gr.

d'extrait) auxquels on ajoute 140 cm³ d'extrait de Saturne. Après essorage, on obtient 1.380 cm³ de liquide déféqué dans lequel on précipite l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. On essore et on obtient finalement 1.280 cm³ de liquide correspondant à 83 gr. d'extrait. Après évaporation à sec, sous pression réduite, à + 50°, on obtient un extrait qu'il faut traiter à de nombreuses reprises par l'éther acétique hydraté et bouillant pour arriver à l'épuiser. Après dessiccation dans le vide, l'extrait épuisé pèse 61 gr. On l'épuise à trois reprises par 1.000 cm³ d'alcool à 95°, à l'ébullition.

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué dans ces trois liquides :

Le premier liquide en renfermait	15 gr.,136	par litre.
Le deuxième — — —	6 gr.,804	—
Le troisième — — —	3 gr.,622	—

Soit en tout 25 gr.,562 de sucres réducteurs. On n'a pas effectué une quatrième opération. Par évaporation à sec, sous pression réduite, des liquides alcooliques réunis, on a obtenu 38 gr. d'extrait. On a repris cet extrait par 500 cm³ de l'alcool méthylique dont on a déjà parlé. Après dissolution à froid et agitation avec du noir animal, on a filtré, puis on a lavé le filtre avec de l'alcool méthylique et on a complété, avec le même alcool, à 700 cm³. Le liquide étant assez peu foncé pour être examiné au polarimètre, on a déterminé sa rotation. On a dosé le sucre réducteur, puis on a ajouté 7 gr. d'émulsine. On a obtenu les résultats suivants :

	Rotation (l = 2)	Sucre réducteur pour cm ³
	—	gr.
Au départ	+ 46°	3,659
Après 10 jours...	— 20°	2,856
— 20 — ..	— 1° 18'	2,524
— 30 — ..	— 1° 24'	2,410

Renouvellement de l'émulsine le 30^e jour.

Après 50 jours...	— 1° 34'	2,312
— 70 — ..	— 1° 42'	2,256
— 90 — ..	— 1° 44'	2,213

Renouvellement de l'émulsine le 90^e jour.

Après 110 jours..	— 1° 44'	2,213
-------------------	----------	-------

Pour un changement de déviation de 2°30', la quantité de sucre réducteur a diminué de 1 gr.,446. Si on calcule la quantité pour 1°, on trouve 0 gr.,578 et si on fait le même calcul avec les chiffres obtenus précédemment dans la détermination du titre de l'alcool méthylique (1 gr.,4206 de glucose disparu pour un changement de déviation de 2°34') on trouve 0 gr.,553. Les deux chiffres sont assez rapprochés pour qu'on puisse penser qu'il ne s'est pas fait d'autres réactions au cours de l'essai.

En s'appuyant sur la proportion de glucose qui se combine dans l'alcool méthylique employé (69,05 pour 100), on trouve qu'il existait dans les 3 gr.,659 de produits réducteurs initiaux 2 gr.,094 de glucose, soit une proportion de 57.22 p. 100.

On a essayé les 2 émulsines qui avaient agi dans le liquide. On a obtenu les déviations polarimétriques suivantes :

	Emulsine recueillie le 30 ^e jour.	Emulsine recueillie le 90 ^e jour.
Déviation initiale (l=2).	+ 2°14'	+ 2°14'
Après 3 jours.....	+ 1°44'	+ 1°36'
— 7 —	+ 1°	+ 50'
— 12 —	+ 30'	+ 20'
— 17 —	+ 10'	+ 2'

L'activité de ces 2 émulsines n'était donc que peu ralentie et on devait penser que l'équilibre était atteint. On a néanmoins procédé à la troisième vérification : addition de glucose.

A 50 cm³ du liquide renfermant 2 gr.,213 de sucre réduc-

teur pour 100 cm³, on a ajouté une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,006 pour 100 cm³. On a fait agir 0 gr.,50 d'émulsine. On a obtenu les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³
	gr.
Après addition de glucose.....	3,219
— 10 jours	3,067
— 20 —	2,892
— 40 —	2,682
— 60 —	2,517
— 80 —	2,517

Soit une diminution de 0 gr.,702 de glucose, alors que le calcul indique 0 gr.,694. Le glucose ayant disparu conformément à la théorie, l'équilibre était atteint dans l'essai.

On a extrait le méthylglucoside β du liquide restant. On a filtré pour éliminer l'émulsine et on a évaporé à sec, sous pression réduite, le liquide filtré. L'extrait obtenu a été épuisé à l'ébullition par l'éther acétique hydraté. On l'a traité, dans ce but, à trois reprises, par 500 cm³ d'éther acétique. Le méthylglucoside β a cristallisé par refroidissement et repos dans le liquide du premier traitement. Il s'est formé sur les parois du flacon des cristaux en lames carrées tout à fait caractéristiques, dont quelques-uns avaient au moins 5 millimètres de côté. On a réuni les liquides éthéro-acétiques et on les a évaporés à sec, sous pression réduite. On a repris l'extrait par l'eau et on a filtré. Par distillation, sous pression réduite, de la solution aqueuse, on a obtenu un extrait qu'on a dissous, à l'ébullition, dans une petite quantité d'alcool à 95°. Le méthylglucoside β a cristallisé par refroidissement. On l'a recueilli et on l'a séché à l'air. Il y en avait 2 gr. environ. Il possédait un pouvoir rotatoire de $\alpha_D = -32^{\circ},38$ ($p = 0,8336$; $v = 15$; $l = 2$; $\alpha = -3^{\circ}36'$).

Le méthylglucoside β pur possède un pouvoir rotatoire de $\alpha_D = -32^{\circ},5$.

En résumé, l'application de la méthode proposée par BRIDEL et ARNOLD permet de caractériser facilement le glucose existant dans l'extrait de Gentiane et d'extraire le méthylglucoside β formé.

Le glucose existait dans l'extrait de Gentiane essayé dans la proportion de 57,22 p. 100 des produits réducteurs qui s'étaient dissous dans les trois traitements à l'alcool à 95°.

2° Extrait de Muguet

On a dissous 100 gr. d'extrait de Muguet dans quantité suffisante d'eau distillée pour faire 1400 cm³ de solution. La défécation de cette solution n'est complète qu'avec un quart de son volume d'extrait de Saturne. A 1400 cm³, on a ajouté 350 cm³ d'extrait de Saturne. Après essorage du volumineux précipité plombique formé, on a recueilli 1410 cm³ de liquide déféqué dans lequel on a éliminé l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. On a essoré et on a obtenu finalement 1310 cm³ de liquide correspondant à 75 gr. d'extrait. La solution évaporée à sec, sous pression réduite, sans dépasser + 50°, a donné 35 gr. d'un extrait qu'on a épuisé à l'éther acétique hydraté et bouillant. Il a fallu faire 7 traitements successifs par 500 cm³ d'éther acétique pour arriver à l'épuisement. L'extrait épuisé pesait 30 gr. On l'a traité par 1000 cm³ d'alcool à 95°, à l'ébullition. L'alcool à 95° a dissous une quantité de produits réducteurs s'élevant à 2 gr.,912 pour 1000 cm³. Un deuxième traitement n'a sensiblement rien dissous : 75 gr. d'extrait de Muguet ne renfermaient donc que 2 gr.,912 de produits réducteurs. Par distillation à sec, sous pression réduite, de l'alcool à 95°, on a obtenu 20 gr. d'extrait qu'on a repris par 150 cm³ d'alcool méthylique. On a obtenu une liqueur presque noire qui ne s'est pas décolorée sensiblement par agitation avec du noir animal. On a filtré et on a complété à 150 cm³ en ajoutant le même alcool méthylique.

On a dosé le sucre réducteur et l'on a ajouté 1 gr.,50 d'émulsine,

On a obtenu les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³
	gr.
Au départ.....	1,587
Après 10 jours.....	1,471
— 20 —	1,471

Renouvellement de l'émulsine le 20^e jour :

Après 30 jours.....	1,446
— 40 —	1,440
— 50 —	1,434

Renouvellement de l'émulsine le 50^e jour :

Après 60 jours.....	1,409
— 70 —	1,381
— 90 —	1,381
— 110 —	1,381

Soit une diminution de 0 gr.,206 de sucre réducteur, correspondant à 0 gr.,298 de glucose, soit une proportion de 18,7 pour 100 des produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95°.

Remarquons la marche très lente de la synthèse qui ne repart qu'après chaque addition de ferment pour s'arrêter bientôt. D'ailleurs les 3 émulsines ayant servi dans cet essai et recueillies le 20^e, le 50^e et le 110^e jour, ont pris une teinte foncée indiquant qu'un dépôt a dû se faire à leur surface pendant leur séjour dans l'alcool.

L'essai de ces 3 émulsines a été fait : on a trouvé que leur action était pour ainsi dire nulle. Avec l'émulsine retirée le 20^e jour de l'essai, on a constaté un changement de la déviation de la solution de glucose de 6' seulement en 17 jours alors que l'émulsine neuve amenait un changement de 2°18' et les émulsines ayant servi dans l'extrait de Gentiane, un changement de 2°4' et de 2°12'.

L'émulsine ayant séjourné dans l'essai du 20^e au 50^e jour n'a eu aucune action et l'émulsine ayant séjourné

dans l'essai du 50^e au 110^e jour, a amené un changement de 14' en 17 jours.

Pour reconnaître si l'action glucosidifiante était bien terminée, on a recouru à la vérification par addition d'une quantité connue de glucose. On a dissous 0 gr.,3128 de glucose dans une quantité suffisante du liquide en expérience pour faire 30 cm³.

Le quantité de sucre réducteur de ce liquide pour 100 cm³ a donc passé de 1 gr.,381 à 2 gr.,424, soit une addition de 1 gr.,043 de glucose. On a fait agir l'émulsine et l'on a obtenu les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³
	— gr.
Au départ.... (110 ^e jour).....	2,424
Après 15 jours (125 ^e —).....	1,960
— 35 — (145 ^e —).....	1,905
— 55 — (165 ^e —).....	1,905

Renouvellement du ferment le 55^e jour :

Après 85 jours (195 ^e jour).....	1,750
— 105 — (215 ^e —).....	1,710

Renouvellement du ferment le 105^e jour :

Après 115 jours (225 ^e jour).....	1,700
— 125 — (235 ^e —).....	1,700

Il a donc disparu en 115 jours, 0 gr.,724 de glucose, alors que la quantité prévue par la théorie pour 1 gr.,043 de glucose est de 0 gr.,720. L'équilibre était donc bien atteint au moment où l'on a ajouté le glucose.

Remarquons qu'il a fallu renouveler deux fois encore l'émulsine pour arriver à ce nouvel équilibre.

Les émulsines retirées de l'essai le 55^e jour, le 105^e et le 125^e jour, ont été essayées sur la même solution de glucose. Les deux premières étaient pour ainsi dire sans action, alors que la troisième, qui n'avait séjourné que 20 jours dans le liquide, possédait encore une assez grande

activité ; en 17 jours, la rotation de la solution de glucose a passé de $+ 2^{\circ}14'$ à $+ 1^{\circ}10'$, soit un changement de $1^{\circ}4'$.

On a utilisé la partie du liquide dans laquelle on n'avait pas ajouté de glucose (90 cm³ environ) pour caractériser le méthylglucoside β formé, malgré la faible quantité de ce produit existant dans le liquide : 0 gr.,222 pour 100 cm³. Le liquide évaporé à sec a laissé un résidu pesant 13 gr. Ce résidu a été traité à trois reprises, par 100 cm³ d'éther acétique hydraté et bouillant. On a réuni les éthers acétiques et on a distillé à sec. Le résidu a été repris par l'eau en présence de carbonate de calcium. La solution aqueuse filtrée a été évaporée à sec et le résidu repris par une petite quantité d'alcool à 95°. Après filtration, on a ajouté au liquide deux volumes d'éther, ce qui a amené la formation d'un précipité gélatineux qu'on a séparé par filtration. Le liquide a été concentré ensuite au bain-marie en un sirop épais, qui a donné quelques rares cristaux en lames carrées, caractéristiques de méthylglucoside β .

En résumé, malgré la faible proportion de produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95°, existant dans l'extract de Muguet (2 gr.,912 pour 75 gr. d'extract), on a pu caractériser le glucose qui représente 18,7 p. 100 de ces produits réducteurs. Le méthylglucoside β a été identifié par ses caractères microscopiques.

3^o Extrait de styles de Maïs.

On a dissous 100 gr. d'extrait de styles de Maïs dans quantité suffisante d'eau distillée pour faire 1400 cm³. Il faut une très forte quantité d'extrait de Saturne pour arriver à une défécation complète : pour 1400 cm³ de liquide, 420 cm³ d'extrait de Saturne ont été nécessaires. Le précipité plombique était très volumineux et a retenu une forte quantité de liquide, puisque sur 1820 cm³, je n'ai obtenu que 1345 cm³ après essorage. Il existait dans le liquide essoré une forte quantité de plomb, et le précipité de sulfure de plomb produit par l'hydrogène sulfuré était également volumineux. On a obtenu finalement 1210 cm³ de liquide débarrassé de plomb. Cette quantité correspond à 66 gr.,50 d'extrait environ; la perte est donc considérable.

Ce liquide évaporé à sec, sous pression réduite, sans dépasser + 50°, a laissé un extrait pesant 44 gr., qu'on a épuisé par l'éther acétique hydraté, à l'ébullition. L'éther acétique a enlevé 8 gr. de matières dont la majeure partie était insoluble dans l'eau, comme je m'en suis assuré après distillation de l'éther acétique.

L'extrait insoluble (36 gr.) a été traité, à l'ébullition par 1000 cm³ d'alcool à 95°. Le liquide alcoolique ne renfermait que 0 gr.,914 de produits réducteurs pour 1000 cm³. Un second traitement identique a donné un liquide ne renfermant pour ainsi dire pas de produits réducteurs. L'extrait insoluble dans l'alcool à 95° et pesant 9 gr. ne renfermait pas de produits réducteurs.

Par distillation à sec, sous pression réduite, des liqueurs alcooliques, on a obtenu un extrait pesant 27 grammes

qu'on a repris par 100 cm³ d'alcool méthylique ; la dissolution a été totale. On a agité avec du noir animal et on a filtré. On a complété le volume du liquide à 150 cm³ avec le même alcool méthylique.

On a dosé le sucre réducteur et on a ajouté 1 gr.,50 d'émulsine. On a obtenu les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³ .
	gr.
Au départ.....	0,579
Après 10 jours.....	0,568
— 20 —	0,571
— 30 —	0,571
Renouvellement de l'émulsine le 30 ^e jour.	
Après 40 jours	0,555
— 70 —	0,545
Renouvellement de l'émulsine le 70 ^e jour.	
Après 90 jours	0,534
— 110 —	0,534
Renouvellement de l'émulsine le 110 ^e jour.	
Après 130 jours	0,541
— 150 —	0,541

Malgré une durée de l'expérience de 5 mois, la diminution de sucre réducteur a été très faible. Si on tient compte des derniers chiffres obtenus le 130^e et le 150^e jour, la diminution est de 0 gr.,038, et l'on ne peut pas dire s'il existait du glucose dans l'extrait de styles de Maïs essayé.

On a fait agir les émulsines recueillies au cours de ce long essai sur la solution de glucose dans l'alcool méthylique. On a suivi la marche des réactions au polarimètre et on a obtenu les résultats suivants ;

	Emulsine recueillie le 30 ^e jour	Emulsine recueillie le 70 ^e jour	Emulsine recueillie le 110 ^e jour	Emulsine recueillie le 150 ^e jour
Déviati ⁿ initiale (l = 2)...	+ 2°14'	+ 2°14'	+ 2°14'	+ 2°14'
— après 3 jours.	+ 2° 4'	+ 2° 2'	+ 2°	+ 1°44'
— — 7 —	+ 1°56'	+ 1°46'	+ 1°46'	+ 1°
— — 12 —	+ 1°42'	+ 1°32'	+ 1°28'	+ 32'
— — 17 —	+ 1°32'	+ 1°18'	+ 1° 8'	+ 20'
— — 22 —	+ 1°14'	+ 1° 6'	+ 54'	+ 10'
— — 36 —	+ 40'	+ 20'	+ 30'	+ 2'

Remarquons que les quatres émulsines essayées sont encore toutes actives et que c'est celle qu'on a recueillie à la fin de l'essai qui possède l'activité la plus grande. La faible combinaison de sucre réducteur qu'on a observée dans l'essai ne vient donc pas de la destruction du ferment. Pour être sûr que ce fait était dû à l'absence du glucose ou à sa présence en quantité minime, on a ajouté du glucose au liquide de l'essai, qu'on avait encore à sa disposition (100 cm³ environ). On a ajouté une quantité de glucose s'élevant à 1 gr.,278 pour 100 cm³. Il devait disparaître de cette quantité 0 gr.,882. Le liquide renfermait après l'addition de 1 gr.,278 de glucose 1 gr.,819 de produits réducteurs. On a fait agir l'émulsine et l'on a obtenu les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³ — gr.
Au départ.....	1,819
Après 10 jours.....	1,625

Après 20 jours	1,538
— 30 —	1,469
— 40 —	1,325
— 50 —	1,315

Renouvellement de l'émulsine le 50^e jour :

Après 60 jours	1,006
— 70 —	0,930
— 80 —	0,930

Il a donc disparu 0 gr.,880 de glucose, en 70 jours, alors qu'il aurait dû en disparaître 0 gr.,882 : la concordance est excellente et l'on peut dire que si l'émulsine n'a pas provoqué une synthèse plus forte dans cet essai, c'est qu'il n'y avait qu'une quantité infime de glucose en solution.

En résumé, l'extrait de styles de Maïs essayé ne renfermait que peu ou point de glucose. Comme tout le liquide a été employé pour l'addition de glucose, on n'a pas jugé utile de caractériser le méthylglucoside β .

4° Extrait de Digitale.

On a dissous 100 gr. d'extrait de Digitale dans quantité suffisante d'eau distillée pour faire 1400 cm³. Pour arriver à une défécation complète de la solution ainsi obtenue il a fallu employer 3 cm³,5 d'extrait de Saturne pour 20 cm³. A 1340 cm³, on a ajouté, en conséquence, 235 cm³ d'extrait de Saturne. On a essoré le plus possible le précipité plombique et on a obtenu 1320 cm³ de liquide déféqué limpide dans lequel on a fait passer un courant d'hydrogène sulfuré pour éliminer l'excès de plomb. Après essorage du précipité de sulfure de plomb, il restait 1255 cm³ de liquide, correspondant à 76 gr. environ d'extrait de Digitale.

Ce liquide a été évaporé à sec, sous pression réduite, à + 50° : il est resté un extrait pesant 43 gr. qu'on a épuisé par l'éther acétique, en opérant, à trois reprises, avec 500 cm³ de liquide. On a effectué ici une vérification dans le but de savoir si l'éther acétique dissolvait du glucose. Pour cela, on a réuni les trois traitements à l'éther acétique et on les a évaporés à sec sous pression réduite. On a obtenu ainsi un extrait pesant 7 gr. dont on verra le traitement plus loin (page 37).

Pour revenir à l'extrait épuisé par l'éther acétique, on l'a desséché dans le vide, puis traité à trois reprises par 1000 cm³ d'alcool à 95° bouillant.

La première reprise a dissous 2 gr.,453 de produits réducteurs pour 1000 cm³, la deuxième 1 gr.,047 et la troisième n'en renfermait pas.

On a réuni les deux premières reprises et on les a distillées à sec sous pression réduite. L'extrait, pesant 28 gr., a été repris par 150 cm³ d'alcool méthylique dans

lesquels il s'est dissous entièrement. On a filtré après agitation avec du noir animal et on a complété le volume à 200 cm³ avec le même alcool méthylique. On a dosé les produits réducteurs et on a ajouté 2 gr. d'émulsine:

On a observé les résultats suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³ — gr.
Au départ.....	1,843
Après 10 jours	1,755
— 20 —	1,700
— 30 —	1,660
Renouvellement de l'émulsine le 30 ^e jour :	
Après 50 jours	1,591
— 70 —	1,591
Renouvellement de l'émulsine le 70 ^e jour :	
Après 90 jours.....	1,543
— 110 —	1,543
Renouvellement de l'émulsine le 110 ^e jour :	
Après 130 jours	1,543

On a donc constaté une diminution de sucre réducteur de 0 gr.,300, ce qui correspond à une quantité de glucose de 0 gr.,434,représentant une proportion de 23,5 pour 100 des produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95°. Comme on le verra par la suite, l'éther acétique ayant entraîné des substances réductrices qui ne sont pas du glucose, la proportion du glucose existant dans les produits réducteurs totaux est encore plus faible.

Remarquons que l'émulsine n'agit que fort peu et qu'on ne constate une action que dans les premiers jours de la présence du ferment dans le liquide. Les émulsines employées dans cet essai ont été essayées sur la solution de glucose dans l'alcool méthylique. Les émulsines recueillies

le 30^e jour, le 70^e jour, et le 110^e jours n'avaient qu'une activité très faible. En 17 jours la rotation de la solution de glucose a passé de $+ 2^{\circ}14'$ à $+ 1^{\circ}54'$. Au contraire l'émulsine recueillie le 130^e jour et qui n'avait séjourné que 20 jours dans le liquide sans provoquer d'ailleurs aucune diminution de la quantité de sucre réducteur, possédait encore une activité normale.

L'examen polarimétrique du liquide dans lequel on l'a fait agir a donné les résultats suivants :

	Déviation (l = 2)
Au départ.....	+ 2°14'
Après 3 jours.....	+ 1°34'
— 7 —	+ 58'
— 12 —	+ 32'
— 17 —	+ 20'

Ce fait permettait de penser que l'équilibre était atteint puisqu'une émulsine encore active n'avait pas agi. On a ajouté, néanmoins, dans une partie du liquide une quantité de glucose correspond à 0 gr.,874 pour 100 cm³, et on a fait agir l'émulsine. Le glucose a disparu dans le liquide de la façon suivante :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³ — gr.
Au départ.....	1,417
Après 10 jours	1,288
— 20 —	1,151
— 30 —	1,075

Renouvellement du ferment le 30^e jour :

Après 50 jours	0,927
— 70 —	0,907
— 90 —	0,884

Renouvellement du ferment le 90^e jour :

Après 110 jours	0,839
— 130 —	0,839

Soit une diminution de sucre réducteur de 0 gr.,578 alors qu'on aurait dû en constater une de 0 gr.,600. La concordance est bonne et l'équilibre était bien atteint dans le liquide au moment où on a ajouté le glucose.

On n'a pas essayé les émulsines ayant servi au cours de cette vérification.

On a essayé de caractériser le méthylglucoside β formé dans le liquide dans lequel on n'avait pas ajouté de glucose, malgré la faible quantité qui devait y exister : 0 gr.,323 pour 100 cm³. On a opéré exactement comme on l'a dit pour l'extrait de Muguet, et l'on a obtenu quelques rares cristaux en lames carrées caractéristiques du méthylglucoside β .

Extrait éthéro-acétique — L'extrait éthéro-acétique pesant 7 gr. a été repris par de l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 100 cm³. Le liquide filtré renfermait 1 gr.,029 de sucre réducteur, calculé en glucose, pour 100 cm³. Pour reconnaître s'il n'existait pas de glucose dans ce produit réducteur dissous dans l'éther acétique, on a évaporé le liquide à sec et on l'a repris par 75 cm³ d'alcool méthylique. On a agité la solution avec du noir animal et on l'a filtrée ; on a complété à 100 cm³ avec le même alcool méthylique. Après avoir dosé le sucre réducteur, on a ajouté 1 gramme d'émulsine. Le liquide renfermait au départ 0 gr.,954 de sucre réducteur pour 100 cm³. Le 30^e jour, cette quantité de sucre n'avait pas varié. On a renouvelé le ferment le 30^e jour et, 20 jours après, on a retrouvé la même quantité de 0 gr.,954 pour 100 cm³.

On a essayé les deux émulsines utilisées dans cet essai ; elles avaient gardé, toutes les deux, une bonne activité comme le montrent les déviations suivantes :

	Emulsine recueillie le 30 ^e jour	Emulsine recueillie le 50 ^e jour
Au départ	+ 2°14'	+ 2°14'
Après 3 jours	+ 1°44'	+ 1°40'
— 7 —	+ 1° 2'	+ 1°
— 12 —	+ 36'	+ 34'
— 17 —	+ 24'	+ 20'

S'il n'y avait pas une diminution dans la quantité de sucre réducteur, cela ne tenait donc pas à la destruction du ferment.

Pour en être absolument sûr, on a ajouté dans le liquide une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,460 et on a fait agir l'émulsine. La disparition du glucose s'est faite normalement comme le prouvent les chiffres suivants :

	Sucre réducteur pour 100 cm ³
	gr.
Au départ.....	2,114
Après 20 jours.....	1,660
— 40 —	1,572
— 60 —	1,403
Renouvellement du ferment le 60 ^e jour :	
Après 80 jours.....	1,308
— 100 —	1,308

Soit une disparition de 0 gr.,806 de glucose, alors qu'il aurait dû en disparaître 0 gr.,801. On doit conclure de cet essai que l'extrait éthéro-acétique ne renfermait pas de glucose. L'éther acétique est donc un excellent liquide à employer pour éliminer certains principes de l'extrait et c'est à juste titre que BRIDEL et ARNOLD l'ont préconisé dans leur méthode.

En résumé, l'extrait de Digitale renferme une faible quantité de glucose, 23,5 pour 100 des produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95° et seulement 15,4 si on tient compte des produits réducteurs enlevés par l'éther acétique.

5° Extrait de Belladone.

On a dissous 100 gr. d'extrait dans quantité suffisante d'eau distillée pour faire 1400 cm³. Pour obtenir une défécation complète, on a ajouté à 1320 cm³ de liquide, 480 cm³ d'extrait de Saturne. Après essorage du précipité plombique, il y avait 1510 cm³ de liquide d'où on a précipité l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. On a essoré de nouveau et on a obtenu finalement 1310 cm³ de liquide correspondant à 68 gr.,6 d'extrait de Belladone.

Par évaporation sous pression réduite sans dépasser + 50°, il est resté un extrait pesant 50 gr. Pour épuiser cet extrait à l'éther acétique, il a fallu le traiter à l'ébullition, à quatre reprises, par 500 cm³ de ce liquide. L'extrait épuisé, séché dans le vide, ne pesait plus que 35 gr.

On l'a traité par l'alcool à 95° bouillant pour dissoudre les produits réducteurs. La plus grande quantité de l'extrait s'est dissoute dans le premier traitement de 1000 cm³ qui ne renfermait, pourtant, que 0 gr.,834 de produits réducteurs pour 1000 cm³. Le second traitement n'a pas dissous traces de produits réducteurs.

Par distillation de l'alcool du premier traitement, il est resté un extrait pesant 30 gr. et ne renfermant que le trentième de son poids, à peine, de produits réducteurs.

L'épuration de cet extrait par cette méthode, n'est donc pas bonne. On a continué, néanmoins, l'opération. On a repris l'extrait par 125 cm³ d'alcool méthylique : la dissolution a été totale et l'agitation avec le noir animal n'a pas décoloré le liquide. On a filtré et on a complété à 150 cm³. On a dosé le sucre réducteur. Le

dosage est difficile et très long à faire. L'oxydule de cuivre qui se forme est très léger et n'arrive pas à se déposer même après un long repos. En filtrant à travers le filtre d'amiante utilisé dans la méthode MOHR-BERTRAND, le précipité colmate très vite ce filtre et plus rien ne passe. Il faut plus d'une heure pour arriver à faire un dosage qui ne demande normalement pas plus de dix minutes et l'on ne peut être sûr de l'exactitude du dosage.

On a fait agir l'émulsine sur ce liquide qui renfermait, au départ, 0 gr.,39 de sucre réducteur. Après 50 jours, cette quantité n'avait pas varié : on a trouvé 0 gr.,40. Le ferment a été renouvelé le 50^e jour. On a retrouvé la même quantité de sucre réducteur le 70^e jour et le 90^e jour. On a renouvelé le ferment le 90^e jour : le ferment n'a pas encore agi.

On a essayé alors les trois émulsines qui avaient séjourné dans le liquide 50, 40 et 30 jours. Elles étaient très fortement colorées en brun. Elles ont été incapables de combiner le glucose à l'alcool méthylique.

J'ai voulu voir si cette destruction du ferment était complète ou si l'émulsine pourrait combiner du glucose qui serait ajouté dans cet essai. J'ai fait dissoudre une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,05 pour 100 cm³ et j'ai fait agir l'émulsine. Après une action de 20 jours, la quantité de sucre a passé de 1 gr.,45 à 1 gr.,40. L'action était à peu près nulle et un essai de l'émulsine a montré que le ferment était détruit. J'ai renouvelé le ferment et je l'ai laissé agir encore pendant 20 jours : la quantité de sucre réducteur était la même.

Il est donc impossible de savoir si l'extrait de Belladone renferme du glucose puisque le ferment ne peut pas agir dans un liquide contenant cet extrait en dissolution. Je n'ai pu me rendre compte de ce qui empêchait l'action du ferment, mais je pense que l'on peut attribuer cet empêchement à un précipité qui se forme sur l'émulsine et qui

supprime tout contact entre l'émulsine et le liquide. Les émulsines retirées de cet essai sont, en effet, très foncées. Ce qui est intéressant, c'est que nous allons retrouver le même fait avec un extrait obtenu avec une plante de la même famille, la Jusquiame.

6° Extrait de Jusquiame.

On a dissous 110 grammes d'extrait dans quantité suffisante d'eau distillée pour faire 1.540 cm³. La défécation est complète en ajoutant 5 cm³ d'extrait de Saturne à 20 cm³ de solution. On a obtenu 1.400 cm³ de liquide qu'on a débarrassé de plomb par un courant d'hydrogène sulfuré. On a essoré le précipité de sulfure de plomb et l'on a obtenu finalement 1.275 cm³ de solution correspondant à 73 gr. d'extrait.

Cette solution a été évaporée, sous pression réduite, à + 50°. L'extrait jaune clair obtenu, pesant 63 grammes, s'est pris entièrement en une masse de cristaux en aiguilles. Sans se préoccuper, pour l'instant, de cette cristallisation on a continué l'opération en épuisant l'extrait, à l'ébullition, par l'éther acétique dans lequel les cristaux ne se sont pas dissous. L'extrait, épuisé par l'éther acétique et séché dans le vide pesait 53 grammes. On l'a traité par l'alcool à 95° pour dissoudre les produits réducteurs. Comme avec l'extrait de Belladone, la majeure partie de l'extrait s'est dissoute au cours du premier traitement par l'alcool à 95° bouillant. La solution obtenue ainsi ne renfermait que 0 gr.,370 de produits réducteurs, c'est à-dire, une quantité encore plus faible que la solution correspondante obtenue avec l'extrait de Belladone. L'extrait non dissous dans ce premier traitement, a été traité de nouveau par 1.000 cm³ d'alcool à 95° bouillant : le liquide obtenu ne renfermait pas de produits réducteurs. La partie insoluble dans l'alcool à 95° était constituée par les cristaux dont on a déjà parlé et dont on verra l'étude à la fin du chapitre,

On a distillé le liquide alcoolique renfermant 0 gr.,370 de produits réducteurs. Le résidu pesait 39 grammes. Ici, encore, comme avec l'extrait de Belladone, la purification dont le but est de concentrer les produits réducteurs dans une petite quantité d'extrait n'a pas donné de bons résultats. L'extrait soluble dans l'alcool à 95° ne renferme en effet que le centième de son poids de produits réducteurs.

Il était légitime de penser qu'on allait rencontrer avec l'extrait de Jusquiame les mêmes empêchements qu'avec l'extrait de Belladone pour caractériser le glucose. On verra par la suite de l'essai qu'il en a été bien ainsi.

L'extrait provenant de l'évaporation de l'alcool à 95°, pesant 39 grammes, a été repris par 125 cm³ d'alcool méthylique dans lequel il s'est dissous entièrement. On a agité avec du noir animal ; on a filtré et on a complété à 150 cm³ avec de l'alcool méthylique. On a obtenu ainsi un liquide très coloré dans lequel le dosage des sucres réducteurs est aussi pénible que dans le liquide provenant de l'extrait de Belladone. Il renfermait 0 gr.,17 de sucres réducteurs pour 100 cm³. On a ajouté 1 gr.,50 d'émulsine et l'on a effectué de temps en temps le dosage. Comme dans le cas précédent, cette émulsine n'a amené aucune diminution du sucre réducteur. On a renouvelé l'émulsine le 50^e jour et l'on a retrouvé la même quantité de sucre réducteur dans les dosages effectués le 70^e et le 90^e jour. On a renouvelé le ferment le 90^e jour et il n'y a pas eu d'action décelable. Les émulsines ayant séjourné dans le liquide 50, 40 et 30 jours étaient très fortement colorées et dépourvues de toute action sur le glucose en solution méthylique.

Les résultats sont donc en tous points comparables jusqu'ici à ceux qu'on a obtenus dans l'essai de l'extrait de Belladone.

J'ai ajouté au liquide une quantité de glucose corres-

pondant à 1 gr.,39 pour 100 cm³. L'émulsine n'a pu combiner ce glucose à l'alcool méthylique, puisque, 20 jours après l'addition du ferment, le liquide renfermait encore 1 gr.,55 alors qu'il en renfermait 1 gr.,56 au départ.

Il est donc impossible de savoir si l'extrait de Jusquiame renferme du glucose : cet extrait, en solution méthylique, amène la destruction de l'émulsine, et empêche toute action du ferment.

Le traitement de l'extrait de Jusquiame m'a permis de faire une observation intéressante au sujet des cristaux dont j'ai parlé tout à l'heure.

Examen des cristaux. — Les cristaux insolubles dans l'alcool à 95° ont été repris à chaud par l'alcool à 80° dans lequel ils se sont dissous. La solution a été filtrée bouillante. Par refroidissement, il s'est formé un grand nombre de cristaux en aiguilles occupant tout le volume du liquide. On a recueilli ces cristaux : il y en avait 5 grammes. On les a fait recristalliser dans l'alcool à 80° en décolorant au préalable la solution chaude par agitation avec du noir animal. On a obtenu d'abord un produit cristallisé en aiguilles, puis une seconde cristallisation a donné un produit cristallisé en cubes.

L'étude de ces produits nous a montré qu'on était en présence d'un mélange de sels minéraux dans lequel dominait le nitrate de potassium, qui était accompagné d'un peu de chlorure de potassium.

La présence d'une forte proportion de principes minéraux dans la Jusquiame est connue depuis fort longtemps.

En 1835, BRAULT et POGGIALE (1), en cherchant à isoler l'hyosciamine de la Jusquiame ont obtenu une poudre blanche cristallisée de nature minérale qu'ils ont reconnue comme renfermant des acétates, des phosphates, des sul-

(1) Examen chimique de la digitale pourprée et de la jusquiame (*Journ. Pharm. Chim.*, 2^e série, **21**, 1835, p. 134.)

fates et des chlorures de potassium, de calcium et de magnésium.

Remarquons qu'ils ne signalent pas la présence des azotates.'

En 1869, THOREY (1), dans un travail fort important, a établi que les feuilles sèches de Jusquiame renfermaient jusqu'à 2 pour cent d'azotate de potassium et que les feuilles cueillies avant la floraison en renfermaient plus que les feuilles cueillies au moment où la plante était en pleines fleurs.

Enfin, en 1903 (2), ARCOCK, ayant examiné des cristaux qui s'étaient formés spontanément dans un extrait de Jusquiame, a reconnu que ces cristaux étaient constitués par du chlorure de potassium à peu près pur.

Je n'apporte donc là rien de nouveau. Toutefois j'ai été frappé de la facilité avec laquelle ces cristaux se formaient dans l'extrait de Jusquiame déféqué ; comme l'extrait de Belladone, traité de la même façon, n'avait pas donné traces de cristaux, j'ai pensé qu'il y aurait peut-être là un moyen de différencier ces deux extraits, ce qui est impossible à l'heure actuelle.

J'ai cherché à opérer sur une petite quantité d'extrait de façon que cet essai puisse se faire facilement, et à n'employer que des réactifs simples existant dans toutes les pharmacies.

Je m'étais arrêté au mode opératoire suivant :

On dissout 0 gr.,50 d'extrait dans 8 cm³ d'eau distillée et on ajoute 2 cm³,5 de sous-acétate de plomb liquide ; on filtre et on obtient 5 cm³ de liquide dans lequel on élimine l'excès de plomb par addition de 3 cm³ d'acide sulfurique dilué au dixième. On filtre de nouveau et on évapore le liquide filtré au bain marie en sirop épais. On ajoute alors

(1) Ueber Hyoscinamin (*Schweiss, Wochenschr f. Pharm.*, 7, 1869, page 264).

(2) Leristals in extracts (*Pharm. Journ.*, 4^e série, 17, 1903, p. 152).

2 cm³ d'alcool à 95° et on mélange, il se forme immédiatement un précipité très dense et *entièrement* cristallisé. Au microscope, ce précipité se présente formé de lames minces et de fines aiguilles.

J'ai appliqué ce mode opératoire à 6 extraits de Jusquiame provenant de six maisons différentes de droguerie et à un extrait fabriqué par moi-même ; j'ai toujours obtenu le précipité caractéristique cristallisé.

Ce procédé marche également bien sur la teinture de Jusquiame. Il suffit d'opérer sur 20 cm³ de teinture qu'on évapore au bain marie. On reprend l'extrait par 8 cm³ d'eau distillée et l'on continue comme précédemment.

On peut même obtenir la formation de cristaux caractéristiques avec les pilules de Méglin. On dissout 10 pilules dans 10 cm³ d'eau, on filtre pour éliminer l'oxyde de zinc insoluble ; on défèque la solution filtrée par 4 cm³ de sous-acétate de plomb et l'on opère comme précédemment. L'extrait de Valériane, traité dans les mêmes conditions ne donne pas de cristaux.

J'ai appliqué ensuite cet essai à l'extrait de Belladone et je dois dire immédiatement que je n'en ai pas obtenu ce que j'en attendais. Sur 6 extraits de Belladone du commerce que j'ai essayés, quatre ne m'ont donné qu'un précipité très léger dans lequel il n'y avait pas de cristaux. et deux m'ont donné un précipité dense, cristallisé, absolument semblable à celui que fournit l'extrait de Jusquiame. Un extrait de Belladone que j'ai préparé m'a donné également un précipité cristallisé et il en a été de même d'une teinture de Belladone.

Dans ces conditions, j'ai renoncé à appliquer mon procédé à la différenciation des extraits de Jusquiame et de Belladone.

CONCLUSIONS.

J'ai appliqué, à six extraits de la Pharmacopée française: extraits de Gentiane, de styles de Mais, de Muguet, de Digitale, de Belladone et de Jusquiame, la méthode proposée par BRIDEL et ARNOLD pour reconnaître la présence du glucose dans les végétaux, suivant le procédé biochimique donné, en 1920, par BOURQUELOT et BRIDEL.

Les résultats que j'ai obtenus ont été les suivants :

1° Avec l'extrait de Gentiane, l'émulsine a combiné .
1 gr.,446 de sucre réducteur sur une quantité initiale de 3 gr.,659. La combinaison portant dans l'alcool méthylique employé comme dissolvant sur 69,05 pour 100 du glucose en solution, les produits réducteurs renfermaient, pour 3 gr.,659, 2 gr.,094 de glucose, soit 57,22 pour 100. Le méthylglucoside β formé a été obtenu à l'état pur et cristallisé, et caractérisé par ses formes cristallines et par son pouvoir rotatoire.

2° Avec l'extrait de Muguet, l'émulsine a combiné
0 gr.,206 de glucose sur 1 gr.,587 de produits réducteurs.
0 gr.,206 de glucose correspond à une quantité de 0 gr.,298 de glucose en solution, soit 18,7 pour 100 des produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95°.

L'équilibre était atteint au moment où on a arrêté la

réaction (110° jour), puisque du glucose ajouté à la liqueur s'est combiné dans les proportions prévues.

Le méthylglucoside β formé était en trop petite quantité pour qu'il soit possible de l'extraire à l'état cristallisé. On a pu néanmoins le caractériser au microscope par la forme de ses cristaux.

3° Avec l'extrait de styles de Maïs, l'émulsine n'a fait diminuer la quantité des sucres réducteurs que de 0 gr.,038 sur 0 gr.,579. Cette proportion est trop faible pour qu'on puisse affirmer ici la présence du glucose.

S'il ne s'est presque rien combiné, c'est qu'il n'existait que peu de glucose puisque les émulsines employées avaient conservé une activité normale et que du glucose ajouté s'est combiné conformément à la théorie.

4° Avec l'extrait de Digitale, il s'est produit, sous l'action de l'émulsine, une diminution de 0 gr.,300 de sucre réducteur sur une quantité initiale de 1 gr.,843. Il existait donc une quantité de glucose de 0 gr.,434, représentant une proportion de 23,5 p. 100 des produits réducteurs solubles dans l'alcool à 95°. Le méthylglucoside β formé a été caractérisé comme dans le cas de l'extrait de Muguet par la forme microscopique de ses cristaux.

L'éther acétique ayant dissous une quantité de produits réducteurs voisine de 1 gramme, j'ai reconnu qu'il n'existait pas de glucose dans ces produits réducteurs.

5° Avec les extraits de Belladone et de Jusquiame, il m'a été impossible d'appliquer le procédé. L'émulsine est tuée très rapidement dans le liquide d'essai et je n'ai pu déceler aucune action synthétisante, même après y avoir fait dissoudre du glucose. Il est possible que cela soit dû à la précipitation sur l'émulsine d'un produit qui supprime tout contact entre le ferment et le liquide.

6° L'extrait de Jusquiame renfermant une forte proportion de matières minérales qui cristallisent facilement dans l'extrait déléqué, j'ai pensé utiliser cette propriété à la différenciation des extraits de Jusquiame et de Belladone, différenciation impossible à l'heure actuelle.

J'ai indiqué une méthode qui donne sûrement un produit cristallisé avec les extraits de Jusquiame, mais comme j'ai obtenu avec quelques extraits de Belladone les mêmes cristaux, il m'a fallu renoncer à ce procédé de différenciation.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

J. BOUGAUIT.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. APPELL.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION.....	5
CHAPITRE PREMIER. — Opérations préliminaires.....	11
CHAPITRE II. — Méthode de Bridel et Arnold pour la caractérisation biochimique du glucose.....	16
CHAPITRE III. — Application de la méthode à six extraits de la Pharmacopée française.....	21
1° Extrait de Gentiane..	21
2° Extrait de Muguet.....	26
3° Extrait de styles de Maïs.....	30
4° Extrait de Digitale.....	34
5° Extrait de Belladone.....	39
6° Extrait de Jusquiame	42
CONCLUSIONS	47

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.



